

[MENU](#)   [SEARCH](#)   [INDEX](#)

1 / 1



# JAPANESE PATENT OFFICE

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: 06070765

(43) Date of publication of application: 15.03.1994

(51)Int.Cl.

C12N 9/54  
C11D 3/386  
C12N 15/57  
// C12N 15/57  
C12R 1:07

(21) Application number: 04296360

(71)Applicant:

SHOWA DENKO KK

(22) Date of filing: 08.10.1992

(72) Inventor:

ICHIJIMA EIJI

YAMAGATA YOHEI

### (30)Priority

Priority number: 04207302 Priority date: 10.07.1992 Priority country: JP

(54) PROTEASE, GENE CODING THE SAME, METHOD FOR PRODUCING THE PROTEASE AND ITS USE

(57) Abstract:

**PURPOSE:** To provide a new alkali protease useful for cleanser compositions, etc.

**CONSTITUTION:** (a) The optimal pH: ·11 (stable at a pH of 5-11.5), when reacted with a synthetic substrate: Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA as a substrate at 30° C for 10 min, (b) the optimal temperature: approximately 50° C (perfectly stable up to 55° C and perfectly inactivated at 65° C), when reacted in a 1.0% casein as a substrate at a pH of 10 for 10min, (c) substrate specificity: decomposes the above-mentioned synthetic substrate casein, hemoglobin, clupeine, salmine, and gelatin, (d) isoelectric point: <2.8, (e) mol.wt.: approximately 37000 (SOS-

1	5	12	19
2	6	13	20
3	7	14	21
4	8	15	22
5	9	16	23
6	10	17	24
7	11	18	25
8	12	19	26
9	13	20	27
10	14	21	28
11	15	22	29
12	16	23	30
13	17	24	31
14	18	25	32
15	19	26	33
16	20	27	34
17	21	28	35
18	22	29	36
19	23	30	37
20	24	31	38
21	25	32	39
22	26	33	40
23	27	34	41
24	28	35	42
25	29	36	43
26	30	37	44
27	31	38	45
28	32	39	46
29	33	40	47
30	34	41	48
31	35	42	49
32	36	43	50
33	37	44	51
34	38	45	52
35	39	46	53
36	40	47	54
37	41	48	55
38	42	49	56
39	43	50	57
40	44	51	58
41	45	52	59
42	46	53	60
43	47	54	61
44	48	55	62
45	49	56	63
46	50	57	64
47	51	58	65
48	52	59	66
49	53	60	67
50	54	61	68
51	55	62	69
52	56	63	70
53	57	64	71
54	58	65	72
55	59	66	73
56	60	67	74
57	61	68	75
58	62	69	76
59	63	70	77
60	64	71	78
61	65	72	79
62	66	73	80
63	67	74	81
64	68	75	82
65	69	76	83
66	70	77	84
67	71	78	85
68	72	79	86
69	73	80	87
70	74	81	88
71	75	82	89
72	76	83	90
73	77	84	91
74	78	85	92
75	79	86	93
76	80	87	94
77	81	88	95
78	82	89	96
79	83	90	97
80	84	91	98
81	85	92	99
82	86	93	100

polyacrylamide gel electrophoresis method), (f) perfectly inhibited with phenylmethanesulfonyl fluoride, chymostatin, and antipain. The protease has e.g. the amino acid sequence of the formula. The protease is obtained from the culture solution of a microorganism produced by partially decomposing the genome DNA of the Bacillus NKS-21 strain (FERM P-93) and subsequently transforming with a DNA having a sequence of the formula by a shot gun method.

...  
250 205 350  
TTC TTA TAA AGG GTT GCA TGA STA CGG CAT GCG GAA LST RGA ALT ACG 500  
Leu Ser Ser Ser Phe Val Gln Arg Glu Glu Gln Lys Leu Ser Ser  
255 311 315 380  
TCC ATC AAC TAG Ser Lys Lys \*

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998 Japanese Patent Office

**MENU**   **SEARCH**   **INDEX**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平 6 - 70765

(43) 公開日 平成 6 年 (1994) 3 月 15 日

(51) Int. Cl.  
C12N 9/54  
C11D 3/386  
C12N 15/57  
// (C12N 15/57  
C12R 1/07 )

識別記号

府内整理番号

F I

技術表示箇所

(21) 出願番号 特願平 4 - 296360

(22) 出願日 平成 4 年 (1992) 10 月 8 日

(31) 優先権主張番号 特願平 4 - 207302

(32) 優先日 平 4 (1992) 7 月 10 日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

特許法第 30 条第 1 項適用申請有り 平成 4 年 3 月 5 日  
、社団法人日本農芸化学会発行の「日本農芸化学会誌 6  
6 卷 03 号」に発表

(71) 出願人 000002004

昭和電工株式会社

東京都港区芝大門 1 丁目 13 番 9 号

(72) 発明者 一島 英治

宮城県仙台市太白区郡山 6 丁目 5 番 10 号

(72) 発明者 山形 洋平

宮城県仙台市青葉区上杉 5 丁目 1 番 28 号

(74) 代理人 弁理士 大家 邦久 (外 1 名)

(54) 【発明の名称】プロテアーゼ、それをコードする遺伝子、そのプロテアーゼの製造方法および用途

(57) 【要約】

【構成】バチルス N K S - 21 のゲノム DNA の未発現部分を発現させて得ら

れる下記性質を有するプロテアーゼ、それをコードする遺伝子、そのプロテア

ーゼの製造法及び用途：(1) 至適 pH は 11 以上；(2) 安定 pH は 5 ~ 11.5；(3)

至適作用温度は約 50 °C；(4) pH 1.0 で 55 °C まで安定、65 °C で完全失活；

(5) Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA、カゼイン、ヘモグロビン、クルベイン、サルミ

ン及びゼラチンを分解；(6) アガロース電気泳動法による等電点は 2.8 未満；(7)

) SDS - PAGE 法による分子量は約 37,000；(8) フェニルメタシスルコオニ

ルフルオリド、キモスタチン及びアンチパインにより完全阻害。

【効果】熱、界面活性剤に対して安定性を有し洗浄補助剤などの工業用酵素として有用である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記の性質を有するアルカリプロテアーゼ。

( 1 ) 至適 pH : 合成基質Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA を基質として 30℃で 10 分間反応させた時の至適作用 pH は 11 以上である。

( 2 ) pH 安定性 : 合成基質Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA を基質として 30℃で 10 分間反応させた場合、 pH 5 ~ 11.5 の範囲で安定である。

( 3 ) 至適温度 : 1.0 % カゼインを基質として pH 1.0 で 10 分間反応させた場合、至適作用温度は 50℃付近である。

( 4 ) 热安定性 : pH 1.0 で 10 分間処理した時、 55℃まで全く安定であり、 65℃で完全失活する。

( 5 ) 基質特異性 : 合成基質Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA 、カゼイン、ヘモグロビン、クルベイン、サルミンおよびゼラチンを分解する。

( 6 ) 等電点 : アガロースゲル電気泳動法による等電点は 2.8 未満である。

( 7 ) 分子量 : SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により測定した場合の分子量は約 37,000 である。

( 8 ) 化学物質に対する影響 : フェニルメタンスルフォニルフルオリド、キモスタチンおよびアンチバイオににより完全に阻害される。

【請求項 2】 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のアルカリプロテアーゼ。

【請求項 3】 請求項 2 に記載のアルカリプロテアーゼをコードする配列番号 1 で示される遺伝子。

【請求項 4】 バチルス属 NKS-21 菌 ( 激工研条寄第 93 号 ) のゲノム DNA を部分分解し、ショットガン法で配列番号 1 で示される配列を有する DNA を形質転換した微生物を培養して、その培養液からアルカリプロテアーゼを取得することを特徴とする請求項 1 または 2 に記載のアルカリプロテアーゼの製造方法。

【請求項 5】 請求項 3 に記載の遺伝子を導入した形質転換微生物を培養して、その培養液からアルカリプロテアーゼを取得することを特徴とする請求項 1 または 2 に記載のアルカリプロテアーゼの製造方法。

【請求項 6】 請求項 1 または 2 に記載のアルカリプロテアーゼを含有することを特徴とする洗浄剤組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、新規なアルカリプロテアーゼ、それをコードする遺伝子、およびそのプロテアーゼの製造方法および用途に関する。さらに詳しく言えば、バチルス属 NKS-21 菌のゲノム DNA の未発現部分を導入した形質転換微生物を培養して得られる界面活性剤や熱に対する安定性に優れた新規なアルカリプロテアーゼ、それをコードする遺伝子、そのプロテアーゼの製造方法および用途に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 バチルス属細菌が分泌する典型的な菌体外産生蛋白のアルカリプロテアーゼは、皮革加工用、食品工業用、洗剤添加用、医薬品用など多岐にわたって利用されている。しかし、自然界から得られる微生物由来の野生型アルカリプロテアーゼは、その特性において十分満足できるものではなく、産業上利用するためには、温度、pH、酸素、溶媒、圧力、酸化剤、界面活性剤、その他の反応液中の添加剤などに対する安定性を改良する必要がある。

【0003】 特に洗浄補助剤として添加されるプロテアーゼは、粉末タイプのみならず、液体タイプの洗剤に配合された状態で十分な安定性を示し、さらに十分な機能を発揮することが望まれる。しかし、液体タイプの洗剤中では、粉末タイプと比べてプロテアーゼの安定性が低く、製品として保存されている間に分解を受けたり洗浄中に失活するなどの問題があり、十分な洗浄効果を上げるに至っていない。

【0004】 そこで、①新しい界面活性剤の開発、②安定化剤の添加、③酵素のマイクロカプセル化等により酵素の液体洗剤中での安定性を向上させる技術が多数開示されている ( 特開平 2-41398 号、米国特許第 4287082 号、英國特許第 2021142 号、特開昭 62-593 号、特開昭 63-137996 号等 ) 。

【0005】 しかし、酵素の安定化技術と共に、酵素自体の液体洗剤中での安定性が従来品よりもより優れたものが強く求められるようになり、安定性に優れたアルカリプロテアーゼを生産する新規な微生物の探索が行なわれている。また、より安定性に優れ、応用価値の高いプロテアーゼが常に求められており、いわゆる蛋白質工学により、アミノ酸配列の部位特異的変更を用いたプロテアーゼの安定性の改良の開示もなされている ( 歐州特許第 0130756 号、米国特許第 4760025 号等 ) 。

【0006】 洗剤添加用アルカリプロテアーゼは、その殆どが比較的の高温度で高い活性を示すものが多い中で、バチルス属 (*Bacillus* sp.) NKS-21 株 ( 以下、バチルス NKS-21 という。 ) は、比較的低い温度で活性を有するアルカリプロテアーゼ A P I - 21 ( 以下、 A P I - 21 といふ。 ) を菌体外に生産することが知られており ( 特公昭 60-55118 号 ) 、その後この菌体の変異株である S D - 515 株 ( 激工研菌寄第 9368 号 ) はアルカリプロテアーゼ S D P - 515 ( 以下、 S D P - 515 といふ。 ) を生産することが明らかにされている ( 特開平 1-281084 号参照 ) 。

さらに、本出願人は、この NKS-21 株由来の A P I - 21 のアミノ酸配列を遺伝子改変技術を用いた特異的部位改変により、より安定なプロテアーゼの生産を提案している ( 特願平 3-180313 号参照 ) 。

## 【0007】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の課題は、バチ

ルスNKS-21のゲノムDNA中の未発現部分を発現させて安定性に優れたアルカリプロテアーゼを提供し、さらにそのプロテアーゼをコードする遺伝子、そのプロテアーゼの製造方法、およびそのプロテアーゼ特に洗浄剤組成物に対する用途を提供することにある。上記課題を達成するために、本発明者らは、低温性アルカリプロテアーゼの生産菌として公知であるバチルスNKS-21菌のゲノムDNAを制限酵素により部分分解した断片をショットガン法により導入して形質転換した微生物を培養しスクリーニングを行なった。

【0006】本発明で用いたバチルスNKS-21は、バチルス属に属する好気性有胞子細菌であり、その詳細な菌学的緒性質は、文献 (Tsuchiya et al., *Curr. Microbiol.*, 14, 7-12 (1986) および特公昭60-55118号公報) に記載されている。本発明では、バチルスNKS-21より得たゲノムDNAを制限酵素Sau 3A Iで部分消化して断片を得たのち、これをアガロースゲル電気泳動にかけ、ジーンクリーン(GENE CLEAN) (Bio 101社製) を用いて2~6 kbのDNA断片のみを調製した。次にこれをショットガン法で大腸菌HB101株に形質転換を行ない、アンピシリンを含むLB-スキムミルク寒天培地で培養し、コロニー周辺のクリアゾーン形成を指標としてアンピシリンに耐性の形質転換体を選択した。

【0009】この形質転換体を新たな同一プレート上で培養し、クリアゾーンを形成させ、培地上でのクリアゾーン形成部分を切り出し、電気泳動用アガロースゲルに埋め込み、電気泳動した。電気泳動終了後、基質のSuc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA(サクシニルアラニルアラニルアクリルアミニルアラニル-4-メチルカマリル-7-アミド)を含有するAtkins-Pantin緩衝液(pH10.0)を含ませたプロテオティンゲル紙を置き、室温で10~30分間反応させ、公知のAPI-21(等電点7.4)とSDP-515(等電点3.8)とは異なる等電点(2.8未満)を有する新規なプロテアーゼを得、トランスイルミネーター上で蛍光が生じるのを確認した。

【0010】かくしてスクリーニングしたプロテアーゼ生産株を培地に植菌し培養し、得られた培養液を遠心分離して、上清として粗酵素液を得、この粗酵素液をカラムクロマトグラフィーで精製して蛋白的に均一な精製酵素を得た。この精製酵素は、API-21と類似した基質特異性を示すことが確認された。

【0011】さらに、この基質特異性においては、ケルベインやサルミン等のアルギニンに富む塩基性蛋白質を非常によく分解することが本プロテアーゼの大きな特徴であり、このことは、本プロテアーゼが非常に低い等電点を持つことに関係するものと考えられる。従って、以上の性質により、本プロテアーゼは、バチルスNKS-21由来の菌株から産生されるAPI-21やSDP-515とは異なる新規なプロテアーゼであることが確認

された。

【0012】本プロテアーゼをコードする遺伝子の構造解析を行なったところ、配列番号1に示すようにTTGにより始まる0.97 kbのオープンリーディングフレームを見出した。さらに、このDNA配列より推定されるアミノ酸配列を調べたところ、活性中心にはセリンが存在するセリンプロテアーゼであることが確認された。

【0013】これを、最も良く知られているバチルス属細菌の菌体外セリンプロテアーゼであるズブチリシン群のアミノ酸配列と比較したところ、通常ズブチリシン間では互いに80%程度の相同性を示すのに対して、API-21やSDP-515も含めて約40%程度の相同性しか示さなかった。また、これまでに知られているセリンプロテアーゼのうち最も相同性の高いものを検索したところ、バチルス・ズブチリスの細胞内セリンプロテアーゼ(ISP-1)との相同性が高いことがわかったが、それでも50%程度の相同性しか示さなかった。

【0014】そのN末端にはシグナルシークエンスに相当すると思われるアミノ酸配列は見出せなかった。従つて、本プロテアーゼは、構造的にも、従来にない新規なプロテアーゼであることが明らかであり、また、熱や界面活性剤に対してより高い優れた安定性を持つことが確認された。

#### 【0015】

【課題を解決するための手段】本発明は、

1) 下記の性質を有するアルカリプロテアーゼ：

(1) 至適pH：合成基質Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCAを基質として30°Cで10分間反応させた時の至適作用pHは1.1以上である；

20 (2) pH安定性：合成基質Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCAを基質として30°Cで10分間反応させた場合、pH5~11.5の範囲で安定である；

(3) 至適温度：1.0%カゼインを基質としてpH1.0で10分間反応させた場合、至適作用温度は5.0°C付近である；

(4) 热安定性：pH1.0で10分間処理した時、5.5°Cまで全く安定であり、6.5°Cで完全失活する；

(5) 基質特異性：合成基質Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA、カゼイン、ヘモグロビン、クルベイン、サルミンおよびゼラチンを分解する；

【0016】(6) 等電点：アガロースゲル電気泳動法による等電点は2.8未満である；

(7) 分子量：SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により測定した場合の分子量は約37,000である；

(8) 化学物質に対する影響：フェニレタノールオニルフッオリド、キモスタチンおよびアンチバインにより完全に阻害される；

2) 配列番号1で示されるアミノ酸配列を有する前記

1)に記載のアルカリプロテアーゼ

3)前記2)に記載のアルカリプロテアーゼをコードす

る配列番号1で示される遺伝子、  
5

【0017】4) バチルス属NKS-21菌(微研条  
奇第93号)のゲノムDNAを部分分解し、ショットガン法で配列番号1で示される配列を有するDNAを形質転換した微生物を培養して、その培養液からアルカリプロテアーゼを取得することを特徴とする前記1)または2)に記載のアルカリプロテアーゼの製造方法。

5) 前記3)に記載の遺伝子を導入した形質転換した微生物を培養して、その培養液からアルカリプロテアーゼを取得することを特徴とする前記1)または2)に記載のアルカリプロテアーゼの製造方法、および

6) 前記1)または2)に記載のアルカリプロテアーゼを含有することを特徴とする洗浄剤組成物を提供したものである。

【0018】本発明における新規プロテアーゼは、目的とする遺伝子を微生物中に導入し、その微生物を培地中で培養することにより生産させ、培養液からプロテアーゼを回収することにより取得できる。この際用いるDNAとしては、前記バチルスNKS-21から得られる未発現の遺伝子が用いられるが、このDNA中には少なくとも配列番号1で示される本プロテアーゼ遺伝子または配列番号1で示されるポリペプチドをコードする塩基配列のDNAが含まれていればよく、必ずしもバチルスNKS-21由来の未発現遺伝子全部を含んでいる必要はない。また、本プロテアーゼ構造遺伝子部分に、別のプロモーター領域やシグナル配列、ターミネーター領域等を結合したDNA断片を用いることもできる。この際用いるプロモーター領域やシグナル配列、ターミネーター領域等は遺伝子を導入する宿主菌中でアルカリプロテアーゼを発現、生産することができるものであれば如何なるものを用いてもよい。

【0019】また、宿主菌としては、目的とするプロテアーゼ遺伝子を導入でき、発現、生産可能なものであればどのようなものを用いててもよいが、その生育速度、プロテアーゼ生産性の観点より、工業的生産においてはバチルス属細菌としては大腸菌を用いることが望ましい。宿主菌の形質転換法は、通常用いられる方法で可能である。例えば、プロトプラス法、エレクトロポレーション法、コンピートセル法などにより実施可能である。導入したプロテアーゼ遺伝子は、プラスミド等を用いて染色体外に存在、複製させる方法で安定に保持させてもよいし、染色体中に組み込む方法でもかまわない。染色体外の存在、複製する方法の場合には、宿主菌中で複製可能なベクターを用いる。例えば、大腸菌を宿主菌として用いる場合、pBR322、pUC118、C01E1等を用いることができる。一方、バチルス属細菌の宿主染色体中に組み込む方法では、ベクターを用いないか、あるいは宿主菌内で複製しないものを用いることが望ましい。例えば上記プラスミドあるいはpE194等を用いることができるが、必ずしもこれらに限定されな

い。

【0020】形質転換体の選択は、スキムミルクあるいはカゼインを加えた寒天培地上でのクリアゾーン形成や、導入遺伝子に結合した遺伝子マーカーの発現により行なうことができるが、必ずしもこれらに限られない。上記のようにして得た形質転換体を培養する培地として特に制限はなく、上記形質転換体が生育可能なものであればどのような培地でも用いることができる。培養液からのプロテアーゼの分離精製は、一般的な蛋白質の分離精製法にしたがって行なうことができる。例えば、塩析、イオンクロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー等により可能であるが、必ずしもこれに限るものではない。

#### 【0021】

【酵素活性の測定法】本発明においては酵素の活性は次のような方法で測定した。5.0 mM Atkins-Pantin 緩衝液(pH10.0) 1.5 ml に、1.0 mM になるように合成基質Guc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA をジメチルスルホキシド(DMSO) に溶解させたもの 5 μl を混合し、この混合液に酵素溶液 1.0 μl を添加する。反応温度を30°Cとし、345 nm の励起光より生じる7-アミノ-4-メチルクマリン (AMC) の蛍光を440 nm で検出する。1秒間に1モルのAMCを生成する酵素量を1 katalとする。

#### 【0022】

【実施例】以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

##### 実施例1：大腸菌による新規アルカリプロテアーゼの生産

30 バチルスNKS-21からクローニングされたゲノムDNAの大腸菌への形質転換はショットガン法を用いて行なった。すなわち、バチルスNKS-21のゲノムDNAを制限酵素SalIで部分消化して断片を得た。次にこれをアガロースゲル電気泳動にかけ、ジーンクリーン(GENECLAN) (Biotools社製) を用いて2~6 kbのDNA断片のみを調製した。

【0023】ベクターとしてプラスミドpUC118を用い、制限酵素 HindIIIで消化した。これをフェノール処理、アルカリホスファターゼ処理した後、アガロース電気泳動し、同じくジーンクリーン(GENECLAN) (Biotools社製) を用いて切断断片を調製した。ゲノムDNAの制限酵素切断断片とベクタープラスミドとのライゲーションを行ない、未発現遺伝子を含む、バチルスNKS-21からクローニングされたゲノムDNAの断片が組込まれたプラスミドDNAを得た。

【0024】このプラスミドDNAを用い、大腸菌HB101株に形質転換を行ない、アンビシリコン(5.0 g/m²)が添加されたLB-2%キムミルク寒天培地で37°C、24~28時間培養し、コロニー周辺のクリアゾーン形成を指標としてアンビシリコンに耐性の形質転換体

を選択した。これらの形質転換体を新たな同一プレート上で培養し、クリアゾーンを形成させた。培地上でのクリアゾーン形成部からパンチで断片を取り、電気泳動用のアガロースゲルにはめ込み、そのままアガロース電気泳動にかけた。

【0025】電気泳動終了後、基質として4.0 μMのSuc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCAを含有する0.1 M Atkins-Pantin緩衝液(pH 10.0)を含ませたプロッティングろ紙を置き、室温で10～30分間反応させると、トランクルミネーター上で公知のAP1-21(等電点7.4)とSDP-515(等電点2.8)とは異なる等電点(2.8未満)を有する新規なプロテアーゼを得、Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCAの切断により生じたAMC(7-アミノ-4メチルクマリン)の蛍光が生じるのが確認できた。この新規なプロテアーゼ生産株は、約10,000株に1株の割合で得られた。

【0026】1%酵母エキス、0.1%スキムミルク、および0.5%NaClを含む培地(pH 7.2)100mLを、500mL容坂口フ拉斯コに入れ、115℃で15分間オートクレープで滅菌する。スクリーニングにより得られた新規プロテアーゼ生産株を前記培地に植菌し、26℃で48～72時間振盪培養した。得られた培養液を13,600gで10分間遠心分離し、上清液(90mL)の酵素活性を測定したところ、2nkatat 1.1mLであった。この溶液を凍結乾燥することにより粗酵素末を得た。

#### 【0027】実施例2：新規プロテアーゼの精製

以下、精製操作はすべて4℃以下で操作した。実施例1で得られた粗酵素末1gを、2mMのカルシウムイオンを含有する10 mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.2)(以下、緩衝液Aという。)50mLに溶解させた。この酵素液を、予め緩衝液Aで平衡化したDEAE-TOYOPEARL 650Sカラム(3×8cm)にかけ、0～1.0MのNaCl直線濃度勾配で溶出させた。活性画分を分取し、30%飽和硫酸を加えて沈殿させ、上清を取り、予め30%飽和硫酸を含む緩衝液Aで平衡化させたオクチルセルロファイン(Octyl-cellulofine)(3.4×1.2cm)にかけ、30～0%の硫酸直線濃度勾配で溶出させた。活性画分を分取し、30%飽和硫酸を含む緩衝液Aに対して透析した後、再度同カラムにかけて同条件で溶出を行なった。活性画分を合わせて緩衝液Aにて透析し、硫酸を除去した。これを再度予め緩衝液Aで平衡化したDEAE-TOYOPEARL 650Sカラムにかけ、同じく0～1.0MのNaCl直線濃度勾配で溶出させ、蛋白的に均一な精製酵素(活性収率6%)を得た。

#### 【0028】実施例3：精製酵素の性質

##### (1) pH安定性および至適pHの測定

pH安定性は以下のようない方法で測定した。実施例2で得られたアルカリプロテアーゼを、各pHに調製した。

1 M Britton-Robinson広域緩衝液と等量ずつ混合し、30℃で10分間インキュベートした後、0.1 M Atkins-Pantin緩衝液でSuc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCAを基質として活性の測定を行なった。活性は、酵素反応停止後フェノール試薬、あるいはニンヒドリンを用いて発色させ、比色定量法により求めた。pH 10.0における活性を100として表示した結果を図1に示す。また、至適pHは、上記測定で用いたのと同様の各pHの緩衝液を用いて、30℃で、同じくSuc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCAを基質として活性の測定を行なうことにより求めた。最高の活性を示したpH 11.0での活性を100として表示した結果を図2に示す。図1および2より、本アルカリプロテアーゼは約pH 5～11.5の範囲で安定であり、至適pHが1.1以上であることがわかった。

##### 【0029】(2) 热安定性および至適温度の測定

热安定性は以下のようない方法で測定した。すなわち、同じく実施例2で得られた新規プロテアーゼを、pH 10.0で各温度にて10分間インキュベートした後、Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCAを基質として30℃、pH 10.0で活性の測定を行なった。30℃で処理した時の活性を100として表示した結果を図3に示す。図3より、本アルカリプロテアーゼは約5.5℃まで全く安定であり、6.5℃で完全失活することがわかった。また、至適温度は、pH 10.0で1.0%カゼインを基質とし10分間反応させた時の各温度における活性の測定により求めた。30℃における値を100として表示した結果は図4に示すおりであり、その至適温度は約5.5℃である。

##### 【0030】(3) 等電点の測定

同じく実施例2で得られた新規プロテアーゼを、アガロースゲル電気泳動法を用いて等電点を測定したところ、2.8未満であった。

##### (4) 分子量の測定

同じく実施例2で得られた新規プロテアーゼを、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により分子量を測定したところ、約37,000であった。

##### 【0031】(5) 各種基質に対する活性測定

基質としてカゼイン、オブアルギン、ウシ血清アルブミン、ヘモグロビン、クルベイン、サルミン、リブチム、ゼラチン、およびコラーゲンを用い、各々1%になるように調製し、pH 10.0にて活性測定を行なった。活性測定は、反応停止後、フェノール試薬を用いる方法(Folin-Lowryの方法)およびニンヒドリン法により行った。カゼインに対する活性を100とする相対活性により表示した結果を図5に示す。図5から、合成基質Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA、ヘモグロビン、クルベイン、サルミン、ゼラチンなどの基質に対する活性が高いことがわかる。本プロテアーゼは特に、アルギニンなどの塩基性アミノ酸に富む塩基性蛋白質に対して効果的に作用する。

##### 【0032】(6) 界面活性剤に対する安定性

表1に記載した各種界面活性剤各々0.1%の存在下で、  
60分間、30℃、pH10.0でインキュベートした後、  
カゼインを用いて活性測定を行なった。発色はフェノー

ル試薬を用いて行なった。結果を表1に示す。  
【0033】  
【表1】

第1表：界面活性剤に対する安定性

界面活性剤	相対活性 (%)
無添加	112
S D S <sup>1)</sup>	90
L A S <sup>2)</sup>	122
B r i j 35 <sup>3)</sup>	111
T w e e n 20 <sup>4)</sup>	108
T r i t o n X-100 <sup>5)</sup>	103

1) S D S : ドデシル硫酸ソーダ

2) L A S : 直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ソーダ

3) B r i j 35 : ポリオキシエチレングリコールアルキルエーテル

4) T w e e n 20 : ポリオキシエチレングリコールソルビタンドデシル  
エステル

5) T r i t o n X-100 : ポリオキシエチレングリコール p-t-オ  
クチルフェニルエーテル

【0034】表1より、界面活性剤、特に非イオン性界面活性剤に対して安定であることがわかる。

(7) 化学物質による活性阻害

表2に記載されている濃度の各種化学物質の存在下、30℃で10分間インキュベートした後、合成基質Suc-Al

a-Ala-Pro-Phe-MCA を用いて蛍光分光法により活性を測定した。化学物質を添加しない場合の活性を100として示した結果を表2に示す。

【0035】

【表2】

表 2 : 化学物質による影響

化学物質名	添加濃度 (mM)	相対活性 (%)
無添加	-	100
PMSF <sup>1)</sup>	1.0	1
キモスタチン	0.1	0
アンチパイン	0.1	0

## 1) PMSF : フェニルメタンスルホニルフルオリド

【0036】この結果より、本プロテアーゼはフェニルメタンスルフォニルフルオリド(PMSF)、キモスタチン、アンチパインにより活性は完全に阻害されることがわかった。

## 【0037】実施例3：本プロテアーゼを含有する洗浄剤組成物

本発明酵素を種々の洗剤に配合して血液汚染布の洗浄試験を以下のとおり行なった。

## A. 全血液木綿汚染布の作成

採血直後の新鮮な牛全血液(血液9容に3.8%クエン酸ナトリウム溶液1容を加え、凝固防止したもの)を用い、下記の条件で試布を浸漬汚染してマングルにより70%に絞り上げて均一に汚染した後、室内で直射日光を避けて風乾し、0~5℃の冷暗所に貯蔵した。調製後、10cm×5cmに裁断して洗浄に供した。

## &lt;条件&gt;

試布：10cm×15cm、

汚染液：試布10枚につき100ml、

汚染温度：10±2℃、

汚染時間：5分間(30秒毎に反転)。

## &lt;洗剤の組成&gt;

界面活性剤(LAS系、SDS系またはAOS系)	1.5%
ゼオライト	1.7%
ケイ酸ソーダ	5%
炭酸ソーダ	3%
カルボキシメチルセルロース	1%
水分	8%
硫酸ソーダ	バランス

洗浄結果を表3に示す。

【0040】

## 【0038】B. 洗浄方法

ターゴットメータ(Terg-O-Tometer)を用い、下記の条件で洗浄および濯ぎ(3回)を行なった。

## &lt;洗浄条件&gt;

汚染布：5cm×10cm、

洗剤：0.133% (酵素5nkat/ml)、

浴比：1:8.5、

反転数：105 rpm、

洗浄時間：10分間、

洗濯温度：40℃。

## 30 &lt;濯ぎ条件&gt;

汚染布：5cm×10cm、

浴比：1:8.5、

反転数：105 rpm、

濯ぎ時間：3分間。

濯ぎを終わった布は室内で直射日光を避けて風乾した。

## 【0039】C. 使用洗剤および酵素

洗剤として、下記に示す組成の3種の無リン洗剤を使用した。

【表3】

表3：洗浄試験結果

洗剤 (無リン)	洗浄効率 (%)		
	洗剤なし	洗剤のみ	洗剤+本酵素
L A S <sup>1)</sup> 系洗剤		75	92
S D S <sup>2)</sup> 系洗剤	45	74	90
A O S <sup>3)</sup> 系洗剤		78	91

1) L A S : 直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ソーダ

2) S D S : ドデシル硫酸ソーダ

3) A O S :  $\alpha$ -オレフィンスルホネート

## 【0041】

【発明の効果】本発明の方法により、通常条件下では発現されない非分泌型のアルカリプロテアーゼを生産することができる。また、このプロテアーゼは等電点が低く、熱や界面活性剤に対してより優れた安定性を有する新規なアルカリプロテアーゼである。本発明のプロテアーゼは、洗浄補助剤をはじめとする工業用酵素として有用である。

## 【0042】

【配列表】  
【0043】配列番号：1  
配列の長さ：972  
配列の型：核酸とアミノ酸  
鎖の数：二本鎖  
30 トポロジー：直鎖状  
配列の種類：Genomic DNA

## 配列

TTG AGT AAA GTG AGC CTG ATT CCA TTC AAA GTT GAG AAG GTT CTA AAT	48
Met Ser Lys Val Ser Leu Ile Pro Phe Lys Val Glu Lys Val Leu Asn	
1 5 10 15	
GAC ACA AAG GTT ATT CCG CCC GGT ATT GAA ATG ATT GAA GCA CCA GCC	96
Asp Thr Lys Val Ile Pro Pro Gly Ile Glu Met Ile Glu Ala Pro Ala	
20 25 30	
GTA TGG GAG GCT GGA TAT AAG GGT GGT AAT ACT GTT GTA GCT GTT CTA	144
Val Trp Glu Ala Gly Tyr Lys Gly Gly Asn Thr Val Val Ala Val Leu	
35 40 45	
GAT ACA GGG TGT GAA ACG ACC CAC ATC GAA TTT AAG GAT CAA ATT ATT	192
Asp Thr Gly Cys Glu Thr Thr His Ile Glu Phe Lys Asp Gln Ile Ile	
50 55 60	
GAC GGT CGT AAC TTT ACT ACA GAT GAT AAC AGC GAC CCT GAT AAT GTC	240
Asp Gly Arg Asn Phe Thr Thr Asp Asp Asn Ser Asp Pro Asp Asn Val	
65 70 75 80	
GAA GAT TCT AAC GGT CAT GGT ACT CAC GTC TGC GGA CCC GTC GCT GCC	288
Glu Asp Ser Asn Gly His Gly Thr His Val Cys Gly Pro Val Ala Ala	
85 90 95	

TGT GAG AAT GAC AAG GGC GTC ATT GGT ACC GCC CCA AAA GCG AAA CTG	336
Cys Glu Asn Asp Lys Gly Val Ile Gly Thr Ala Pro Lys Ala Lys Leu	
100 105 110	
CTC GTT GTA AAC GTG CTT AGC GGA CAA GGG TAC GGA GAT ACA AAA TGG	384
Leu Val Val Lys Val Leu Ser Gly Gin Gly Tyr Gly Asp Thr Lys Trp	
115 120 125	
GTC ATT GAA GGG GTT CGT TAT GCG ATA AAT TGG CGT GGA CCA AAC AAT	432
Val Ile Glu Gly Val Arg Tyr Ala Ile Asn Trp Arg Gly Pro Asn Asn	
130 135 140	
GAA CGA GTT CGT GTC ATT TCT ATG TCA CTC GGG GGA AGA ATT GAT ACT	480
Glu Arg Val Arg Val Ile Ser Met Ser Leu Gly Gly Arg Ile Asp Thr	
145 150 155 160	
CCT GAA CTT CAT CAA GCG ATA AAA CAT GCT GTA GCT GAG GAT ATT TTA	528
Pro Glu Leu His Gin Ala Ile Lys His Ala Val Ala Glu Asp Ile Leu	
165 170 175	
GTT GTA TGT GCA GCT GGA AAT GAA GGG GAT GGC AAT CAT GAC ACA GAT	576
Val Val Cys Ala Ala Gly Asn Glu Gly Asp Gly Asn His Asp Thr Asp	
180 185 190	
GAA TAT GCC TAC CCT GGA GCT TAT CCG GAA GTC GTT CAA GTA GGC TCT	624
Glu Tyr Ala Tyr Pro Gly Ala Tyr Pro Glu Val Val Gin Val Gly Ser	
195 200 205	
GTC AAT CTA GAA GGC GAG ATC TCT AGA TTC AGC AAT ACA AAT TGT GCG	672
Val Asn Leu Glu Gly Glu Ile Ser Arg Phe Ser Asn Thr Asn Cys Ala	
210 215 220	
ATT GAC CTT GTC GCA CCA GGC GAA GAA ATT ATT TCA ACT TAT CTT AAC	720
Ile Asp Leu Val Ala Pro Gly Glu Glu Ile Ile Ser Thr Tyr Leu Asn	
225 230 235 240	
AAC GGC TAC GCT GTC TTA TCC GGT ACT TCA ATG GCT ACA CCG CAT GTA	768
Asn Gly Tyr Ala Val Leu Ser Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val	
245 250 255	
TCC GGT GCG GCA GCC CTG TTA ATT GAA CAA GTA GAA AAA GAG TTT GAA	816
Ser Gly Ala Ala Leu Leu Ile Glu Gin Val Glu Lys Glu Phe Glu	
260 265 270	
AGA AAG TTG ACG GAA CCA GAA ATT TTC GCA CAA CTG ATC AAA CAC ACC	864
Arg Lys Leu Thr Glu Pro Glu Ile Phe Ala Gin Leu Ile Lys His Thr	
275 280 285	
GTT TCT CTT AAC TTC AGC CGC CGC GCA CAA GGA AGC GGG CTG TTG AAA	912
Val Ser Leu Asn Phe Ser Arg Arg Ala Gin Gly Ser Gly Leu Leu Lys	
290 295 300	
TTA TCA TCA AGC GTT GTA TCA GTA GAG GAT GCC GAA TAT ACA ACT AGC	960
Leu Ser Ser Ser Val Val Ser Val Glu Asp Ala Glu Tyr Thr Thr Ser	
305 310 315 320	
TCT ATT AAA TAG	972
Ser Ile Lys *	

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明酵素のpH安定性を示すグラフである。

【図2】本発明酵素の至適pH範囲を示すグラフである。

【図3】本発明酵素の熱安定性を示すグラフである。

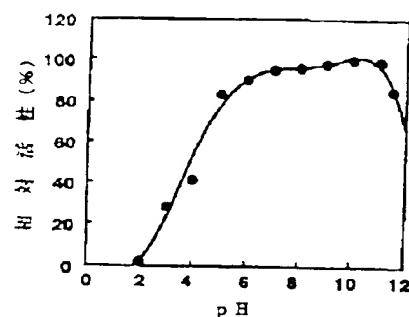
【図4】本発明酵素の至適温度範囲を示すグラフである。

る。

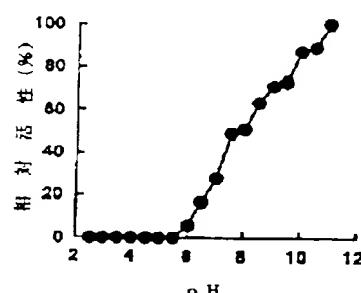
50 【図5】本発明酵素の各基質に対する相対活性を示すグ

ラフである。

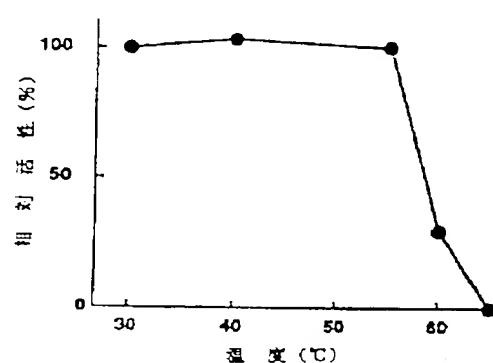
【図 1】



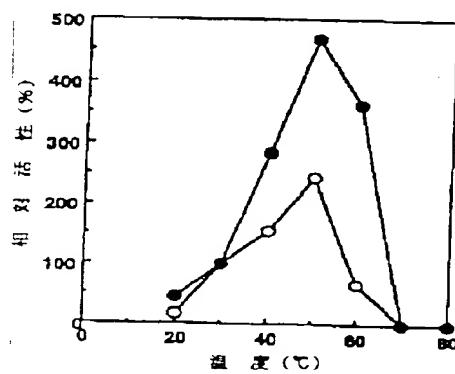
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【図 5】

